

## スピノサド試験法

### 1. 分析対象化合物

スピノシンA、スピノシンD

### 2. 装置

紫外分光光度型検出器付き高速液体クロマトグラフ及び液体クロマトグラフ・質量分析計を用いる。

### 3. 試薬、試液

総則の3に示すものを用いる。

### 4. 標準品

(2*R*,3*aS*,5*aR*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bR*)-2-(6-デオキシ-2,3,4-トリ-*O*-メチル- $\alpha$ -*L*-マンノピラノシルオキシ)-13-(4-ジメチルアミノ-2,3,4,6-テトラデオキシ-- $\beta$ -*D*-エリスロピラノシルオキシ)-9-エチル-2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16*a*,16*b*-ヘキサデカヒドロ-14-メチル-1*H*-8-オキサシクロドデカ[b]as--インダセン-7,15-ジオン (以下「スピノシンA」という。) 本品はスピノシンA90%以上を含む。

融点 本品の融点は84~99.5°Cである。

(2*S*,3*aR*,5*aS*,5*bS*,9*S*,13*S*,14*R*,16*aS*,16*bR*)-2-(6-デオキシ-2,3,4-トリ-*O*-メチル- $\alpha$ -*L*-マンノピラノシルオキシ)-13-(4-ジメチルアミノ-2,3,4,6-テトラデオキシ- $\beta$ -*D*-エリスロピラノシルオキシ)-9-エチル-2,3,3*a*,5*a*,5*b*,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16*a*,16*b*-ヘキサデカヒドロ-4,14-ジメチル-1*H*-8-オキサシクロドデカ[b]as-インダセン-7,15-ジオン (以下「スピノシンD」という。) 本品はスピノシンD90%以上を含む。

融点 本品の融点は161.5~170°Cである。

### 5. 試験溶液の調製

#### a 抽出法

##### (1) 穀類、豆類及び種実類の場合

検体を420  $\mu$ mの標準網ふるいを通して粉砕した後、その20.0 gを量り採り、水50 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル50 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて三角フラスコに吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル及び水の混液(1:1) 50 mLで洗い、洗液を上記の三角フラスコに合わせ、それを200 mLの共栓付きメスシリンダーに移し、アセトニトリル及び水の混液(1:1)を加えて200 mLとする。

##### (2) 果実及び野菜の場合

検体約1 kgを精密に量り、必要に応じ適量の水を量って加え、細切均一化した後、検体20.0 gに相当する量を量り採る。

これにアセトニトリル及び水の混液（1：1）100 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて三角フラスコに吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル及び水の混液（1：1）50 mLで洗い、洗液を上記の三角フラスコに合わせ、それを200 mLの共栓付きメスシリンダーに移し、アセトニトリル及び水の混液（1：1）を加えて200 mLとする。

### (3) 茶の場合

検体を粉碎した後、その5.00 gを量り採り、水50 mLを加え、2時間放置する。

これにアセトニトリル50 mLを加え、3分間細砕した後、ケイソウ土を1 cmの厚さに敷いたろ紙を用いて三角フラスコに吸引ろ過する。ろ紙上の残留物をアセトニトリル及び水の混液（1：1）50 mLで洗い、洗液を上記の三角フラスコに合わせ、それを200 mLの共栓付きメスシリンダーに移し、アセトニトリル及び水の混液（1：1）を加えて200 mLとする。

## b 精製法

### (1) シクロヘキシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シクロヘキシルシリル化シリカゲルミニカラム（2,000 mg）にアセトニトリル10 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで水10 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに  
a 抽出法で得られた溶液100 mLを注入した後、アセトニトリル20 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトニトリル及びトリエチルアミンの混液（49：1）10 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトニトリル及びトリエチルアミンを除去する。この残留物に*n*-ヘキサン10 mLを加えて溶かす。

### (2) シリカゲルカラムクロマトグラフィー

シリカゲルミニカラム（690 mg）にアセトン5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いで*n*-ヘキサン5 mLを注入し、流出液は捨てる。このカラムに(1) シクロヘキシルシリル化シリカゲルカラムクロマトグラフィーで得られた溶液を注入した後、アセトン及び*n*-ヘキサンの混液（1：4）5 mLを注入し、流出液は捨てる。次いでアセトン5 mLを注入し、流出液をすり合わせ減圧濃縮器中に採り、40°C以下でアセトンを除去する。この残留物にアセトニトリル及び水の混液（1：1）を加えて溶かし、正確に1 mLとして、これを試験溶液とする。

## 6. 操作法

### a 定性試験

次の操作条件で試験を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。

操作条件

カラム充てん剤 オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径5 μm）を用いる。

クロマトグラフ管 内径4.6 mm、長さ150 mmのステンレス管を用いる。

カラム温度 40℃

検出器 波長245 nmで操作する。

移動相 アセトニトリル、2%酢酸アンモニウム溶液及びメタノールの混液 (2 : 1 : 2) を用いる。スピノシンAが約10分で、スピノシンDが約13分で流出する流速に調整する。

b 定量試験

a 定性試験と同様の操作条件で得られた試験結果に基づき、スピノシンA及びスピノシンDについてピーク高法又はピーク面積法により定量を行い、それぞれの含量を求め、その和をスピノサドの含量とする。

c 確認試験

a 定性試験と同様の操作条件で液体クロマトグラフィー・質量分析を行う。試験結果は標準品と一致しなければならない。また、必要に応じ、ピーク高法又はピーク面積法により定量を行う。

7. 定量限界

0.01 mg/kg (茶にあっては0.05 mg/kg)

8. 留意事項

スピノサドは、スピノシンA及びスピノシンDのそれぞれについて定量を行い、その含量の和を分析値とすること。

9. 参考文献

なし

10. 類型

A